

β -内酰胺类抗生素残留受体分析法的研究进展

程古月, 彭娟, 王玉莲, 董小冰, 彭大鹏, 郝海红, 黄玲利, 袁宗辉*

(华中农业大学 国家兽药残留基准实验室(HZAU), 农业部食品兽药残留检测重点实验室, 武汉 430070)

摘要: β -内酰胺类抗生素广泛用于动物细菌感染性疾病的治疗和预防, 然而可食性动物产品中的抗生素残留会增加细菌耐药性的发生, 危害人体健康, 还会影响乳制品生产, 导致经济上遭受巨大损失, 因此开发快速可靠的 β -内酰胺类抗生素残留检测方法对于食品安全控制非常必要。受体分析方法因其可以对一类药物进行多残留检测, 具有专一性较强、灵敏度高、自动化程度高等优点, 成为目前 β -内酰胺类抗生素残留筛选方法研究的热点。本文将概述 β -内酰胺类抗生素的受体及其制备方法, 根据标记和检测手段的不同对受体分析法进行分类, 包括放射免疫受体分析法、酶标记受体分析法、胶体金标记受体分析法、酶比色法和结合生物传感器的受体分析法, 并介绍每类方法在 β -内酰胺类抗生素残留检测中的研究进展和应用情况。

关键词: β -内酰胺类抗生素; 残留; 筛选方法; 受体; 标记技术

中图分类号: S859.84; TS207.5

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)03-0354-09

Advances in Receptor-based Screening Methods for the Detection of β -Lactam Antibiotic Residues

CHENG Gu-yue, PENG Juan, WANG Yu-lian, DONG Xiao-bing,

PENG Da-peng, HAO Hai-hong, HUANG Ling-li, YUAN Zong-hui*

(National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues (HZAU), Key Laboratory for the Detection of Veterinary Drug Residues in Foods of Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: β -lactam antibiotics are widely used in clinical medicine. However, antibiotic residues in edible animal products are not only trigger the development of bacterial resistance, which has some adverse effects on human health, but also affect the quality of milk, resulting in economic losses. Therefore, it is necessary to develop rapid and reliable analytical methods for detection of β -lactam antibiotic residues in food safety control. The receptor-based screening method become the hotspot in the research and application of antibiotic screening methods, because of its capability of multi-residue detection of a class of drugs, and its characteristic of specificity, high sensitivity, and high degree of automation. In this article, the β -lactam receptors and their preparation are briefly introduced. The receptor-based screening methods are further classified based on the labeling and detection techniques, including radio-receptor assay, enzyme-labeling receptor assay, colloidal gold-labeling receptor assay, enzyme colorimetry, and biosensor receptor assay. Furthermore, the research progress and application of each type of receptor-based screening method in the

收稿日期: 2013-09-24

基金项目: 国际科技合作项目资助计划(2011DFA32140); 中央高校基本科研业务费专项资金(2013QC002; 2011PY078)

作者简介: 程古月(1982-), 女, 湖北武汉人, 讲师, 博士, 主要从事抗菌兽药作用机理和微生物检测方法的研究, Tel: 027-87287165-8404, E-mail: chengguoyue@mail.hzau.edu.cn

* 通信作者: 袁宗辉(1958-), 男, 湖北天门人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事兽医药理学与毒理学、兽药残留与食品安全和新兽药研发等方面的研究, Tel: 027-87287186, E-mail: yuan5802@mail.hzau.edu.cn

detection of β-lactam antibiotics are reviewed in details.

Key words: β-lactam antibiotic; residue; screening method; receptor; labelling technique

β-内酰胺类抗生素在抑制和杀灭病原微生物和防治动物疾病方面有重要作用,然而其广泛使用导致细菌产生耐药性,引起各国广泛关注^[1-3]。同时,动物源性食品中的β-内酰胺类抗生素残留会危害人类健康、破坏生态环境、影响乳制品的生产^[4-5]。为了控制该类抗生素残留的危害,欧盟的96/23/EC法规^[6]制定了不同动物组织样品中β-内酰胺类抗生素的最大残留限量(MRL)。例如,青霉素G和氨苄西林在牛奶和肌肉组织中的MRL分别是4和50 μg·kg⁻¹^[7]。因此,开发灵敏度和准确度高的β-内酰胺类抗生素检测方法对于食品安全控制非常必要。

β-内酰胺类抗生素的筛选方法主要有微生物学分析法和免疫分析法,具有通量高和成本低的特点,一般用于企业和基层等进行快速检测。微生物学分析法基于抗生素对微生物生理机能和代谢的抑制作用,其工作菌株大多选用枯草芽孢杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌和藤黄八叠球菌等敏感菌株^[8],但该方法无一例外地需要对微生物进行培养,存在检测时间长,检测限难以满足要求,敏感菌株较难筛选等缺点,因此很难实现标准化定量检测。免疫分析法是以抗原抗体识别为核心反应的分析方法,该方法快速、简便、灵敏度高、特异性强,但其中抗体制备技术较为复杂,且由于抗体的特异性高,只能同时检测一种或少数几种药物。

目前MRL标准规定检测的β-类酰胺类残留物大多为有完整β-内酰胺环结构的化合物(除青霉素二乙胺乙酯、头孢匹林和头孢噻吩以外)。然而,β-内酰胺类抗生素的环状结构易发生化学水解或酶水解而失活^[9-10]。在制备此类化合物的抗体时药物因降解而导致制备的抗体不能识别完整的β-类酰胺环^[11],药物的降解产物用ELISA方法也可以被检测到^[12]。当前,受体分析技术成为β-内酰胺类抗生素筛选方法研究的热点。由于受体只能和有活性的物质特异结合,因此受体技术在检测β-类酰胺类药物时准确度更高。同时,受体技术可以检测针对某种受体的一类药物,利用该技术可以同时检测青霉素类和头孢菌素类,实现多残留检测。作者将概述β-内酰胺类抗生素的受体及其制备方法,并根据标记和检测手段的不同详细介绍每类受体技术在β-内

酰胺类抗生素残留筛选中的研究和应用情况。

1 β-内酰胺类抗生素受体分析法概述

1.1 β-内酰胺类抗生素的受体——青霉素结合蛋白

抗生素在细菌中有相应的作用靶位,这些靶位称为抗生素的受体。抗生素通过和其特异的受体结合,阻碍受体功能的正常发挥,从而发挥抗菌作用。β-内酰胺类抗生素的受体为青霉素结合蛋白(penicillin-binding proteins, PBPs),此类蛋白位于细菌细胞膜上,发挥转肽酶和羧肽酶活性,参与细菌细胞壁肽聚糖的生物合成^[13]。D-丙酰胺-D-丙氨酸(D-Ala-D-Ala)是PBPs的天然底物,青霉素等β-内酰胺类抗生素由于其结构与D-Ala-D-Ala类似,可以和PBPs共价结合而取代天然底物,抑制转肽酶和羧肽酶的活性,从而阻止细菌细胞壁的合成^[14]。

PBPs按其相对分子质量大小分为50~100 ku的高分子质量PBP(high-molecular-mass PBP, HMM PBP)和30~40 ku的低分子质量PBP(low-molecular-mass PBP, LMM PBP)。其中,HMM PBP根据功能的不同分为A类和B类。A类HMM PBP的N末端具有糖基转移酶活性,C末端具有肽基转移酶活性;B类HMM PBP仅具有肽基转移酶活性。还有一种HMM PBP,参与革兰阳性菌中β-内酰胺酶的诱导,如地衣芽孢杆菌的BlaR^[15]。LMM PBP具有DD-羧肽酶活性^[16],一般用于酶比色法^[9,17]。细菌种类不同,其PBP的数量、种类和功能有所差异^[18-19](表1),例如枯草芽孢杆菌有十几种PBPs^[20]。不同的PBPs与各种β-内酰胺类药物的亲和力不等,因而呈现不同程度的敏感性^[21]。

1.2 受体的制备技术

抗生素受体分析法的关键在于受体的制备,主要采用以下3种方法:(1)直接利用完整的细菌细胞作为受体,这些细胞含有能够结合多种抗生素的特殊结合靶位。对于细菌的选择要注意其对药物的敏感性和与后续检测步骤的适合度。用这种方法建立的CHARM试剂盒可检测多类抗生素残留,包括β-内酰胺类、氨基糖苷类、氯霉素、新生霉素、大环内酯类、磺胺和四环素类等^[22]。(2)通过提取细菌细胞中某一特定的受体蛋白或者含受体蛋白的细胞组分

表 1 细菌青霉素结合蛋白的分类

Table 1 Classification of bacterial penicillin binding proteins

细菌 Bacteria	高分子质量青霉素结合蛋白 HMM PBP				低分子质量青霉素结合蛋白 LMM PBP
	A 类 Class A		B 类 Class B		
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	PBP1、PBP2c、PBP2d、PBP4		PBP2a、PBP2b、PBP3、 PBP4b、SpoVD、PbpH		PBP4a、PBP4*、PBP5、 PBP5*、DacF、PbpX
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	PBP2		PBP1、PBP2a(MRSA)、PBP3		PBP4
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	PBP1a、PBP1b、PBP2a		PBP2b、PBP2x		PBP3
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	PBP1a、PBP1b、PBP1c		PBP2、PBP3		PBP4、PBP4b、PBP5、PBP6、PBP6b、 PBP7、PBP8、DacD、AmpC、AmpH
结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	PBP1、PBP1A(r)		PBPA、PBP2、PBP-lipo		PBP4、PBP5、PBP7、PBP (Rv0907)、PBP(Rv1367c)

MRSA. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

MRSA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

(如细胞膜、核糖体等)来获得受体。受体蛋白的提取方法包括亚细胞组分的分离方法和蛋白质纯化方法。(3)异源重组表达受体蛋白。用 PCR 方法克隆受体蛋白的基因,将其插入特定的表达载体,在大肠杆菌系统中进行重组表达,利用表达载体上的特异标签进行亲和纯化获得受体蛋白。此方法要注意选择受体基因的来源,还可以通过基因改造来提高受体的表达量、可溶性和活性。例如将 PBP2x 截去 N 端疏水跨膜区,可以增加重组受体蛋白的可溶性,但不影响活性^[23]。目前,多数正在研发的 β -内酰胺类抗生素受体检测技术都用第 3 种方法获得受体。

1.3 β -内酰胺类抗生素受体分析法的原理

抗生素受体分析法是基于抗生素和受体之间的特异性识别反应的分析方法。 β -内酰胺类抗生素受体分析法分为两大类。一类是受体吸附法,该方法基于 β -内酰胺类抗生素与 PBP 的结合,类似于免疫分析法中抗原和抗体的结合^[10]。受体吸附法一般采用 HMM PBP 作为受体,如枯草芽孢杆菌的 PBP2a、肺炎链球菌的 PBP2x 和地衣芽孢杆菌的 BlaR 等,也有将完整细菌细胞或含受体的细胞组分作为受体,如 CHARM 法。受体吸附法可以结合多种标记技术以提高灵敏度,如同位素标记、酶标记和胶体金标记等,既可以标记受体也可以标记药物抗原。另一类是酶比色法^[24],其原理是测定 β -内酰胺

类抗生素对 DD-羧肽酶的灭活程度。DD-羧肽酶对大多数的头孢菌素敏感,但对青霉素的敏感性稍差。受体吸附法或酶比色法均可以和生物传感器联用。

国外在受体分析技术领域研究较早,已利用该技术开发生产出多种检测 β -内酰胺类抗生素的试剂盒^[1,25-27](表 2)。中国的研究由于起步较晚,实际应用主要依赖于进口试剂盒。

2 β -内酰胺类抗生素受体分析法的研发状况

2.1 放射免疫受体分析法

CHARM I 和 CHARM II 法采用放射免疫受体分析技术(radioreceptor assay, RRA),其竞争结合原理与放射免疫分析相似^[28]。通常先将待测样品与一定量的受体反应,然后加入一定量的同位素(¹⁴C 或 ³H)标记药物,反应平衡后,离心去除未与受体结合的标记药物,测定结合的标记药物的放射性,根据结合率推算样品中待测药物的含量。

CHARM I 是专用于牛奶中 β -内酰胺抗生素残留的检测方法,也是美国分析化学家协会(AOAC)承认的第 1 个快速测定法。该方法快速、灵敏,1 个牛奶样品分析只需 15 min。在 1984—1985 年,CHARM I 进一步发展为 CHARM II,除了用于牛奶中抗生素残留的筛选和鉴别外,还可以用于组织和鸡蛋等其他动物产品(样品需用水溶性缓冲液进

表 2 用于检测 β-内酰胺类抗生素的基于受体分析法的商品试剂盒的最低检测限

Table 2 Detection limits (LODs) of commercial receptor-based test kits for the detection of β-lactam antibiotics

商品名称 Test kit	LOD/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)									原理 Principle
	阿莫西林 Amoxicillin	氨苄西林 Ampicillin	青霉素 G Penicillin G	苯唑西林 Oxacillin	氯唑西林 Cloxacillin	双氯西林 Dicloxa- cillin	头孢氨苄 Cephalexin	头孢唑林 Cefazolin	头孢噻吩 Ceftiofur	
	4 ^a	4 ^a	4 ^a	30 ^a	30 ^a	30 ^a	100 ^a	50 ^a	100 ^a	
Delvo-X-Press	4~8	4~8	2~4	25~50	30~60	25~50	25~50	—	4~8	酶标记 受体法
SNAP	6	4~5	2~4	35~40	30	30	—	25~27.5	50	Enzyme-labelling
Parallux	3, 6	2.9	3.2	10	7, 4	20	—	—	33, 7	receptor assay
BetaStar	2~4	2~5	2~4	5~10	5~10	5~10	—	—	75~150	胶体金标记 受体法
TwinSensor	3~5	3~5	2~3	—	4~8	—	—	20~25	10~15	Colloidal gold- labeling
Rosa MRL3	4~5	3~5	2~3	—	20~30	15~25	15~30	12~20	10~20	receptor assay
CHARM II	9	8	3.5	75	50	50	30	30	10	放射性标记受体法 Radio-receptor assay
Penzym	4~6	4~7	4~6	30~50	60~100	—	—	—	40~70	酶比色法 Enzyme colorimetry

^a 欧盟规定的牛奶中 β-内酰胺类抗生素的最大残留限量

^a Maximum residue limits (MRLs) of β-lactam antibiotics in milk set by European Union

行简单的 30 min 的提取)。除了可以检测 β-内酰胺类抗生素外,CHARM II 还可以检测氨基糖苷类、氯霉素、新生霉素、大环内酯类、磺胺和四环素类抗生素,其检测样品范围包括牛奶、肉类、海产品和蜂蜜等^[29-30]。在韩国,CHARM II 还被用于检测动物饲料的抗生素残留,并建立了相应的官方标准。该方法还可以用于畜禽粪便中抗生素残留的检测^[31]。中国采用 CHARM II 试剂盒制定了相关的出入境检验检疫标准(SN/T 1765-2006、2309-2009、2310-2009、2311-2009、2312-2009、2315-2009)来检测乳制品以及动物源性食品中的抗生素残留。

2.2 酶标记受体分析法

酶标记受体分析法类似于 ELISA 反应,可根据包被物质、标记物质和竞争方法的不同组合成各式反应(图 1)。例如,E. Goldberg 等^[32]以枯草芽孢杆菌的 PBP2a 为受体蛋白,加入青霉素类药物反应后混入可以识别复合物的特异性抗体,最后加入酶标二抗,通过底物显色来确定残留药物。该方法可以同时检测青霉素和头孢氨苄,但该方法需要制备特异性的抗体,操作复杂。

以肺炎链球菌 R6 的 PBP2x 为受体,李铁柱^[4]建立了酶标受体方法分别检测牛奶中的青霉素 G 和头孢噻吩。其中青霉素 G 的检测方法为间接竞争受体分析法,先将 PBP2x 包被于微孔板中,加入牛乳样品和生物素标记的氨苄青霉素进行竞争结合,然后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲合素,并混合酶底物进行显色反应,检测限可达 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$;头孢噻吩的检测方法为受体分析结合酶联免疫非竞争法,先包被受体于微孔板,加入牛奶样品和头孢噻吩的单克隆抗体,样品中的小分子半抗原头孢噻吩和受体蛋白结合形成完全抗原,然后被头孢噻吩单抗识别,继续加入 HRP 标记的二抗与头孢噻吩单抗结合,最后加入酶底物显色,检测限可达 $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[33]。孙永海等^[34]同样采用间接竞争受体分析法检测了牛乳中氨苄青霉素残留,检测限为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,有较好的精密度及回收率。

将 PBP2x 截去一段 N 端疏水跨膜区,在大肠杆菌中重组表达获得可溶蛋白 PBP2x*^[23]。J. Lamar 等^[10]将地高辛标记的氨苄西林与 β-类酰胺类药物共同竞争固定在微孔板上的受体 PBP2x* ,

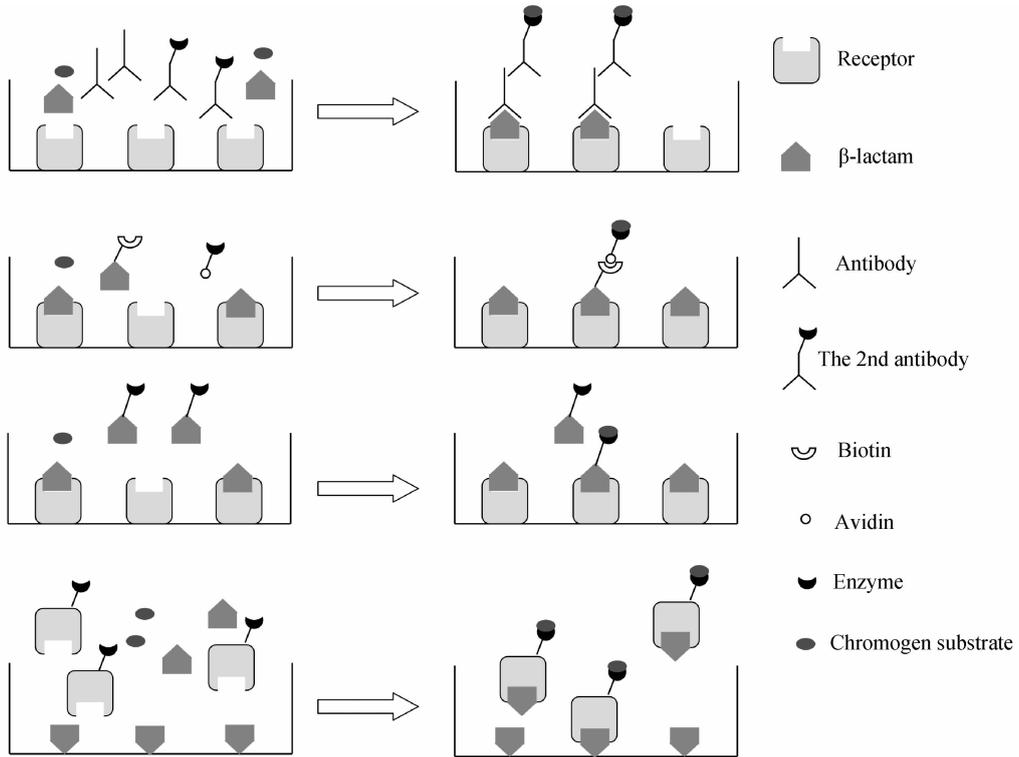


图 1 β -内酰胺类抗生素酶标记受体分析法的原理

Fig. 1 Principle of the enzyme labeled receptor-based screening methods for the detection of β -lactam antibiotics

随后加入 HRP 标记的地高辛抗体,并通过酶-底物显色反应检测样品中 β -内酰胺类药物残留量。用此方法,头孢唑啉、头孢唑肟、头孢哌酮、氯唑西林、氨苄西林和青霉素 G 在各种食物中的检出限均为 $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。以上方法均用到抗体或进行多次标记,操作较为繁琐。

地衣芽孢杆菌的 BlaR 的 C 端区域 (BlaR-CTD) 位于细菌细胞膜外,是 β -内酰胺类药物的结合区域^[35]。J. Degelaen 等^[36] 利用酶标记 BlaR-CTD 设计如下 β -内酰胺类抗生素检测方法:表达融合蛋白 BlaR-CTD- β -内酰胺酶,以磁珠为载体固定头孢菌素,可以检测 6 类 β -内酰胺类药物;用碱性磷酸酶和 HRP 分别标记 BlaR-CTD,包被头孢菌素于微孔板中,利用显色反应能检测 3 类 β -内酰胺类药物;同样以酶来标记受体蛋白,但药物固定于试管上,可检测 6 类 β -内酰胺类药物。这些方法能检测的药物种类较少。

最近, K. Zeng 等^[37] 将 PBP2x* 包被在微孔板上,样品中的 β -内酰胺类药物与 HRP 标记的氨苄西林 (HRP-Amp) 直接竞争受体,去掉未结合的药物以后,通过酶-底物显色反应测定结合在受体上的酶标药物含量。该方法可以检测牛奶中 16 种 β -内

酰胺类药物,检测限均低于欧盟规定的 MRL,整个过程只需花费 45 min。利用肺炎链球菌的 sPBP3* 为受体蛋白,以 HRP-Amp 为标记药物, J. Zhang 等^[38] 建立了直接竞争受体分析法,用于检测牛奶样品中的 β -内酰胺类抗生素残留。sPBP3* 可以识别 11 种青霉素类和 16 种头孢类抗生素,其检测限大多数低于欧盟规定的 MRL。本实验室采用地衣芽孢杆菌 ATCC 14580 的 BlaR-CTD 为受体蛋白,以 HRP-Amp 为标记药物建立了直接竞争受体分析法^[39]。该方法可以检测 15 种 β -内酰胺类药物,其中有 11 种 β -内酰胺类药物的检测限低于欧盟标准。该方法的样品提取方法简便(只需要用磷酸缓冲液抽提),可以用于检测牛奶、牛肉和鸡肉样品中的 β -内酰胺类药物残留。

目前,国际上已有采用酶标记受体分析技术制成的试剂盒,包括 Delvo-X-press β -L test (荷兰)、IDEXX SNAP (美国) 和 Parallax (美国)。Delvo-X-press β -L test 是一种用于检测牛奶中 β -内酰胺类抗生素的定量酶联受体结合分析法。 β -内酰胺类抗生素残留可以被 HRP 标记的 PBP 捕获,待测样品和酶标受体经过孵育以后进一步被转移到表层涂有 β -内酰胺类抗生素的试管中,只有游离的酶标受体能

结合到试管表面,待洗脱后加入酶底物后显色为蓝色,牛奶样品中β-内酰胺类抗生素的量和颜色的强度成反比。Delvo-X-press法将样品和 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 青霉素G浓度水平的标准吸光度进行比较,每个样品管总的测试时间大概 $10\ \text{min}$ ^[40]。IDEXX SNAP也是以酶标受体为原理,其中SNAP β-L test适合于实验室、田间和收奶站检测牛奶样品中的β-内酰胺类抗生素残留。将加热后的奶样放到塑料装置的一端,沿着滤纸移动 $30\ \text{s}$ 后,试剂沿着相反方向流动, $10\ \text{min}$ 内试验结束。可见对照和试验2个色斑出现于装置的中部,颜色既可目视,也可通过比色计读出,样品比对照颜色浅为阳性,比对照颜色深或相同为阴性^[41]。SNAP试剂盒可检测青霉素和头孢菌素^[42],另有SNAP试剂盒可检测四环素、磺胺类和庆大霉素^[43]。Parallux是美国IDEXX公司研发的实验室仪器,可用来检测大量的抗生素及其它干扰发酵的物质^[44]。它可自动进样、混合、温育和读数,其原理为免疫受体,FDA批准其用于β-内酰胺类、羟基类和头孢类的残留检测^[45]。

2.3 胶体金标记受体分析法

J. Degelaen等^[36]以BlaR-CTD为受体蛋白,连接到生物素后,利用胶体金技术标记蛋白, $5\ \text{min}$ 便可检测青霉素G、阿莫西林、氨苄西林、双氯西林、苯唑西林、萘夫西林、头孢匹林、头孢噻吩、头孢唑肟及头孢唑林,检测限均低于欧盟的MRL。

在国外采用胶体金标记受体方法建立的试剂盒主要为比利时生产的BetaStar和TwinSensorBT以及美国生产的Charm Rosa MRL。其中,BetaStar采用胶体金有色微粒标记特异性的β-内酰胺受体,可检测青霉素和头孢菌素,检测时间为 $5\ \text{min}$ (延长保温时间可增加灵敏度)。具体步骤为奶样加到含有试剂的小管中并温育,加入试纸条后会出现2条红色的带,如果试验带比对照带弱,则结果为阳性,反之则为阴性,可测定青霉素和头孢菌素。TwinSensorBT则采用胶体金标记2种受体,可以同时检测β-内酰胺类和四环素类抗生素,其原理与BetaStar类似,检测时间为 $6\ \text{min}$ 。Charm Rosa MRL类似于BetaStar,可检测青霉素和头孢菌素,检测时间为 $3\ \text{min}$ 。

2.4 酶比色法

酶比色法原理是通过测定β-内酰胺类抗生素对DD-羧肽酶的灭活程度来检测牛奶中β-内酰胺类抗生素残留。在此酶作用下,肽底物会释放D-丙氨

酸,D-丙氨酸被氧化成丙酮酸的同时会产生过氧化氢,而过氧化氢可使用氧化还原显色指示剂来测定^[24]。J. Drake等^[46]利用马杜拉放线菌R39的DD-羧肽酶设计了β-内酰胺类抗生素的检测方法和相应的试剂盒,这种方法可测定牛奶中的β-内酰胺类抗生素,检测限为 $0.017\ \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据此原理的Penzym检验(比利时)中有Penzym和Penzym S两种形式,其温浴时间和灵敏度不同^[25]。在Penzym检验中,当指示剂保持黄色不变,则结果为阳性;如指示剂变为粉红色,则结果为阴性;颜色处于粉红和黄色中间,则牛奶中的β-内酰胺类抗生素的定量估计在 $0\sim 0.017\ \text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$,检测时间为 $15\ \text{min}$ 。在Penzym S中,指示剂黄色为阳性结果;如变为桃红色,则为阴性结果。

2.5 结合生物传感器的受体分析法

近年来,生物传感器方法受到了越来越多的青睐,将受体分析法和生物传感器相结合出现了许多新的技术^[47]。S. Setford等^[42]应用固定了PBP的工作电极、Ag/AgCl参比电极和葡萄糖过氧化氢酶标记的β-内酰胺类抗生素来检测牛乳中青霉素G,检测限达到 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,检测过程包括 $2\sim 4\ \text{min}$ 的培养和快速冲洗以及 $1\sim 2\ \text{min}$ 的检测步骤。

G. Cacciatore等^[48]开发了表面等离子体共振生物传感器(SPR)来检测牛乳中β-内酰胺类抗生素残留。将样品和PBP2x*混合,阳性样品中含有的β-内酰胺类抗生素和受体结合,没有结合的受体将与地高辛标记的氨苄青霉素(DIG-AMPI)结合形成复合物。固定在传感器芯片上的地高辛单克隆抗体将识别DIG-AMPI-PBP2x*复合物,传感器芯片表面的反应引起信号变化,其信号变化的大小与样品中β-内酰胺类抗生素的含量成反比,此方法对青霉素G的检测限为 $4\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

E. Gustavsson等^[9]使用SPR结合链霉菌DD-羧肽酶活性抑制试验来检测牛乳中β-内酰胺类抗生素残留。牛奶样品中混合三肽和羧肽酶在 $47\ ^\circ\text{C}$ 条件下孵育 $5\ \text{min}$,其间酶催化三肽水解成二肽。当抗生素存在时,酶活性降低,产生的二肽也随之减少。在反应体系中加入二肽抗体,固定于传感器表面的二肽竞争结合二肽抗体。传感器表面的免疫反应引起信号变化,可间接测得样品中β-内酰胺类抗生素的含量,它与检测信号的大小成正相关。此方法对于青霉素G的检测极限为 $2.6\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,只适用于处理过的牛奶。作者在另2篇报道中,以同样

的反应原理,用 SPR 传感器表面固定的二肽或三肽抗体来检测反应体系中的二肽(产物)或三肽(底物)的含量变化。使用该方法,青霉素 G 在牛奶中的检测限分别为 1.2 和 1.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,该方法假阴性率为 0%,假阳性率为 27%^[17,26]。

3 总结和展望

β -内酰胺类抗生素残留受体分析方法可以结合多种标记技术,以达到更高的灵敏度。放射性标记法虽然灵敏度高,特异性强,取样量少,但是危害健康,污染环境,而且需要专门的检测设备,成本较高;胶体金标记技术简单快速,但只适用于单份测定,且不能定量;酶标记技术环境污染小、酶标记物稳定、成本低,具有广阔的应用前景;生物传感器具有高通量、实时监控、试剂消耗低等特点,但由于设备昂贵限制其在现场检测中的应用,未来还需在设备的便携式上有所改进。

目前荧光标记技术的研究越来越多。荧光标记技术主要采用荧光染料(化学发光)和报告基因(生物发光)这两种方法。E. Benito-pena 等^[49]建立了荧光免疫法,采用荧光物质标记抗体,通过荧光显微镜测定 β -内酰胺类抗生素残留,得到青霉素 G 的检测限为 2.4 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。目前已有采用 GFP 蛋白和荧光素酶作为报告基因的受体分析技术用于检测芳香烃受体激动剂^[50]和雌激素^[51-52]等物质,尚无将此方法用于 β -内酰胺类抗生素检测的报道。量子点作为一种半导体纳米微晶体,其多色标记的特点可以同时检测几种不同的化合物,现已有试验表明量子点可以标记相应抗体用于抗生素的多残留检测^[53-54]。受体分析法与量子点标记的结合应用将进一步扩展抗生素多残留检测的范围。

综上, β -内酰胺类抗生素受体筛选法可以从标记技术上加以改进,以获得更高的灵敏度并扩大检测物质的种类。此外,由于 PBPs 的种类繁多,从中筛选出对 β -内酰胺类抗生素高亲和力的受体并实现标准化产出需要依赖生物技术的不断进步。同时,人们对于筛选系统的小型化和自动化要求也越来越高。随着科技的发展,相信未来会有更多的新的 β -内酰胺类抗生素受体分析方法出现。

参考文献:

[1] KANTIANI L, FARRÉ M, BARCELÓ D. Analytical methodologies for the detection of β -lactam antibiotics

in milk and feed samples [J]. *Trends Analyt Chem*, 2009, 28(6): 729-744.

- [2] CHÁFER-PERICÁS C, MAQUIEIRA A, PU-CHADES R, et al. Fast screening immunoassay of sulfonamides in commercial fish samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396(2): 911-921.
- [3] MITCHELL J M, GRIFFITHS M W, MCEWEN S A, et al. Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance [J]. *J Food Prot*, 1998, 61(6): 742-756.
- [4] 李铁柱. 青霉素结合蛋白克隆表达及在牛乳青霉素残留检测中应用[D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [5] GRUNWALD L, PETZ M. Food processing effects on residues: penicillins in milk and yoghurt [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 483(1-2): 73-79.
- [6] EUROPEAN COMMISSION. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC [S]. *Off J Eur Union*, 1996, L125: 10.
- [7] COMMISSION REGULATION 675/92 [S]. *Off J Eur Commun*, 1992, No. L73/8.
- [8] PIKKEMAAT M, OOSTRA-VAN DIJK S, SCHOUTEN J, et al. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening) [J]. *Food Control*, 2008, 19(8): 781-789.
- [9] GUSTAVSSON E, BJURLING P, STERNESJÖ Å. Biosensor analysis of penicillin G in milk based on the inhibition of carboxypeptidase activity [J]. *Anal Chim Acta*, 2002, 468(1): 153-159.
- [10] LAMAR J, PETZ M. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 586(1-2): 296-303.
- [11] BURMESTER J, SPINELLI S, PUGLIESE L, et al. Selection, characterization and x-ray structure of anti-ampicillin single-chain Fv fragments from phage-displayed murine antibody libraries [J]. *J Mol Biol*, 2001, 309(3): 671-685.
- [12] GAUDIN V, FONTAINE J, MARIS P. Screening of penicillin residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay: comparison of chemical and enzymatic sample pre-treatment [J]. *Anal Chim*

- Acta*, 2001, 436(2):191-198.
- [13] HÖLTJE J V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli* [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(1):181-203.
- [14] WAXMAN D J, STROMINGER J L. Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52:825-869.
- [15] ZHU Y, ENGLEBERT S, JORIS B, et al. Structure, function, and fate of the BlaR signal transducer involved in induction of beta-lactamase in *Bacillus licheniformis* [J]. *J Bacteriol*, 1992, 174(19):6171-6178.
- [16] GOFFIN C, GHUYSEN J M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62(4):1079-1093.
- [17] STERNESJÖ Å, GUSTAVSSON E. Biosensor analysis of beta-lactams in milk using the carboxypeptidase activity of a bacterial penicillin binding protein [J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(3):832-837.
- [18] SAUVAGE E, KERFF F, TERRAK M, et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32(2):234-258.
- [19] 王欣慧, 蒋燕群. 青霉素结合蛋白与革兰阴性细菌耐药性的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(6):820-822.
- [20] SCHEFFERS D J, JONES L J, ERRINGTON J. Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis* [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 51(3):749-764.
- [21] 李冀, 杨慧, 呼延霆, 等. 细菌青霉素结合蛋白[J]. 生命的化学, 2013, 33(4):418-426.
- [22] 罗道栩, 邓国东, 肖田安. Charm II 检测在兽药残留分析中的应用[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(10):21-24.
- [23] LAIBLE G, KECK W, LURZ R, et al. Penicillin-binding protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. Expression in *Escherichia coli* and purification of a soluble enzymatically active derivative [J]. *Eur J Biochem*, 1992, 207(3):943-949.
- [24] ALTHAUS R L, MOLINA M P, RODRIGUEZ M, et al. Detection limits of beta-lactam antibiotics in ewe milk by penzym enzymatic test [J]. *J Food Prot*, 2001, 64(11):1844-1847.
- [25] 叶兴乾, 刘东红, 陈健初. 牛奶抗生素残留快速检测技术进展及应用现状[J]. 农业工程学报, 2005, 21(4):181-185.
- [26] GUSTAVSSON E, STERNESJÖ Å. Biosensor analysis of β-lactams in milk: Comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods [J]. *J AOAC Int*, 2004, 87(3):614-620.
- [27] ŽVIRDAUSKIENĖ R, ŠALOMSKIENĖ J. An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk [J]. *Food Control*, 2007, 18(5):541-547.
- [28] CHARM S, MASS N. Antibiotic detection method: USA patent, 4239745[P]. 1978-11-22.
- [29] KORSRUD G, PAPICH M, FESSER A, et al. Laboratory testing of the Charm test II receptor assays and the Charm farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and penicillin G [J]. *J Food Prot*, 1996, 59(2):161-166.
- [30] BOISON J, MACNEIL J. Chemical analysis for antibiotics used in agriculture [J]. *J AOAC Int*, 1995, 4(6):256-259.
- [31] KWON S I, OWENS G, OK Y S, et al. Applicability of the Charm II system for monitoring antibiotic residues in manure-based composts [J]. *Waste Manag*, 2011, 31(1):39-44.
- [32] GOLDBERG E, PARK J. Assay for beta-lactam antibiotics; USA patent, 4762782 [P]. 1985-5-16.
- [33] 李铁柱, 孙永海, 郝伟东. 受体分析结合酶联免疫检测牛乳中的头孢噻唑残留[J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(3):473-476.
- [34] 孙永海, 张杰, 韩勇, 等. 牛乳中氨基青霉素残留的受体分析法测定[J]. 食品科学, 2010, 31(24):255-258.
- [35] JORIS B, LEDENT P, KOBAYASHI T, et al. Expression in *Escherichia coli* of the carboxy terminal domain of the BLAR sensory-transducer protein of *Bacillus licheniformis* as a water-soluble Mr 26,000 penicillin-binding protein [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 58(1):107-113.
- [36] DEGELAEN J, GRANIER B, FRERE J-M, et al. Process for determining antibiotics containing a β-lactam ring in a biological fluid; USA patent, 6524804B2 [P]. 2003-2-25.
- [37] ZENG K, ZHANG J, WANG Y, et al. Development of a rapid multi-residue assay for detecting beta-lactams using penicillin binding protein 2x* [J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(2):100-109.
- [38] ZHANG J, WANG Z, WEN K, et al. Penicillin-binding protein 3 of *Streptococcus pneumoniae* and its ap-

- plication in screening of beta-lactams in milk [J]. *Anal Biochem*, 2013, 442(2):158-165.
- [39] PENG J, CHENG G, HUANG L, et al. Development of a direct ELISA based on carboxy-terminal of penicillin-binding protein BlaR for the detection of beta-lactam antibiotics in foods [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(27):8925-8933.
- [40] SCANNELLA D, NEAVES P, KEEDY K, et al. An evaluation of the Delvo X-Press β L test for detecting β -lactams in ex-farm raw milks [J]. *Int Dairy J*, 1997, 7(1):93-96.
- [41] NAVRÁTILOVÁ P. Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk—a review [J]. *Czech J Food Sci*, 2008, 26:393-401.
- [42] SETFORD S, VAN ES R, BLANKWATER Y, et al. Receptor binding protein amperometric affinity sensor for rapid β -lactam quantification in milk [J]. *Anal Chim Acta*, 1999, 398(1):13-22.
- [43] CONTRERAS A, PAAPE M J, DI CARLO A L, et al. Evaluation of selected antibiotic residue screening tests for milk from individual goats [J]. *J Dairy Sci*, 1997, 80(6):1113-1118.
- [44] HUTH S P, WARHOLIC P S, DEVOU J M, et al. Parallax beta-lactam: a capillary-based fluorescent immunoassay for the determination of penicillin-G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cephalosporin, and ceftiofur in bovine milk [J]. *J AOAC Int*, 2002, 85(2):355-364.
- [45] SPORTSMAN J, LEYTES L. Miniaturization of homogeneous assays using fluorescence polarization [J]. *Drug Discov Today*, 2000, 5(S1):27-32.
- [46] DRAKE J, MINN M. Method and kit for detecting antibiotics in a liquid sample; USA patent, 4686182 [P]. 1984-12-17.
- [47] HUET A-C, DELAHAUT P, FODEY T, et al. Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods [J]. *Trend Anal Chem*, 2010, 29(11):1281-1294.
- [48] CACCIATORE G, PETZ M, RACHID S, et al. Development of an optical biosensor assay for detection of β -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x* [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 520(1-2):105-115.
- [49] BENITO-PEN˜A E, MORENO-BONDI M C, ORELLANA G, et al. Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of beta-lactam antibiotics [J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(17):6635-6642.
- [50] NAGY S R, SANBORN J R, HAMMOCK B D, et al. Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of ah receptor agonists [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 65(2):200-210.
- [51] BECK V, PFITSCHER A, JUNGBAUER A. GFP-reporter for a high throughput assay to monitor estrogenic compounds [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2005, 64(1):19-37.
- [52] 倪秉强, 段小群, 谭 宁, 等. 建立基于荧光素报告基因系统检测雌激素样物质方法的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2009, 19(3):367-369, 374.
- [53] PENG C, LI Z, ZHU Y, et al. Simultaneous and sensitive determination of multiplex chemical residues based on multicolor quantum dot probes [J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(12):3657-3662.
- [54] CHEN J, XU F, JIANG H, et al. A novel quantum dot-based fluoroimmunoassay method for detection of Enrofloxacin residue in chicken muscle tissue [J]. *Food Chem*, 2009, 113(4):1197-1201.

(编辑 白永平)